

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 31/565, 31/57, 7/48	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/40074 (43) Date de publication internationale: 17 septembre 1998 (17.09.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00457 (22) Date de dépôt international: 6 mars 1998 (06.03.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/02811 10 mars 1997 (10.03.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): VITAS- TEROL (S.A.R.L.) [FR/FR]; 4, rue Guynemer, F-75006 Paris (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): DRAY, Fernand, Joseph [FR/FR]; 4, rue Guynemer, F-75006 Paris (FR). (74) Mandataire: BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).	(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: COSMETIC OR DERMATOLOGICAL USE OF 7-HYDROXYLATED STEROIDS (54) Titre: UTILISATION COSMETIQUE OU DERMATOLOGIQUE DE STEROIDES 7-HYDROXYLES (57) Abstract <p>The invention concerns the use of a 7-hydroxylated steroid in a composition for preventing or treating skin-ageing effects and/or UV radiation effects on the skin. The invention also concerns a cosmetic treatment for skin-ageing effects and/or UV radiation effects on the skin.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne l'utilisation d'un stéroïde 7-hydroxylé dans une composition pour prévenir ou traiter les manifestations du vieillissement cutané et/ou les effets d'irradiations UV sur la peau. L'invention a aussi pour objet un procédé de traitement cosmétique des manifestations du vieillissement cutané et/ou des effets d'irradiations UV sur la peau.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

UTILISATION COSMÉTIQUE OU DERMATOLOGIQUE DE
STÉROIDES 7-HYDROXYLÉS.

La présente invention concerne l'utilisation
5 de stéroïdes 7-hydroxylés pour la préparation de
compositions cosmétiques ou dermatologiques pour prévenir
et/ou traiter les effets cutanés du vieillissement et de
l'action d'irradiations ultra-violettes.

La formation des hormones stéroïdes, leurs
10 interrelations et leurs fonctions ont été largement
décrites dans l'art antérieur. Les fonctions de la
pregnenolone (PREG) et de la déhydroépiandrosterone (DHEA)
ainsi que de certains de leurs dérivés sont notamment
rappelées dans la demande de brevet PCT publiée sous le
15 numéro WO 94/08588.

La DHEA et son dérivé sulfate (S-DHEA) circulent
en quantité importante chez l'homme adulte, mais son taux
diminue avec l'âge (Orentreich & coll., *J. Clin. Endocr.
Metab.* 59: 551-555, 1984). Il a ainsi été proposé, par
20 exemple dans la demande de brevet français publiée sous le
numéro 2 729 854 ou la demande de brevet Européen
correspondante publiée sous le numéro 723 775, d'utiliser
la S-DHEA dans une composition cosmétique à application
topique destinée au traitement de certains signes de
25 vieillissement. De multiples effets de la DHEA ont été
décrits, mais certains s'opposent aux processus et aux
pathologies associées au vieillissement (Watson & coll.,
Drug & Aging 2: 274-291, 1996).

Malgré de nombreuses expérimentations, aucune des
30 explications avancées pour les effets de la DHEA n'a pu
être pleinement prouvée (Kalimi & coll., *Molec. Cell.
Biochem.* 131: 99-104, 1994), et l'utilisation thérapeutique
de la DHEA a révélé des effets secondaires indésirables, en
particulier chez la femme, en tant que précurseur potentiel
35 des hormones androgènes.

Il a maintenant été montré que les dérivés 7-hydroxylés de la PREG et de la DHEA sont formés par un système enzymatique présent dans de multiples tissus et organes, dont la peau, où ils favorisent les mécanismes liés à l'immunité (Morfin & Courchay, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 50: 91-100, 1994). Comme les taux de DHEA circulants, l'activité de ces enzymes hydroxylantes diminue avec l'âge (Doostzadeh & Morfin, *Steroids* 61: 613-620, 1996).

La Demanderesse s'est donc intéressée aux effets de stéroïdes 7-hydroxylés et de leurs dérivés sur les cellules qui constituent la peau humaine et qui sont affectées lors du vieillissement ou après irradiation UV. Les travaux de recherche réalisés par la Demanderesse ont permis de mettre en évidence que les effets des glucocorticoïdes conduisant à l'apoptose cellulaire sont oblitérés par les stéroïdes 7-hydroxylés et que leur action sur les cellules cutanées se traduit par des effets bénéfiques et protecteurs.

De façon surprenante, les résultats obtenus avec les composés de l'invention ne correspondent pas à ceux classiquement attendus avec des hormones stéroïdes. En effet, le processus d'hydroxylation effectué par l'organisme sur la PREG ou la DHEA est irréversible, et de ce fait les hormones stéroïdes classiques ne peuvent plus être produites à partir des dérivés 7-hydroxylés.

En conséquence, l'utilisation de 7-hydroxystéroïdes à des fins cosmétologiques pour traiter ou prévenir les effets cutanés du vieillissement présente des avantages remarquables par rapport aux stéroïdes des compositions cosmétiques de l'art antérieur.

Les travaux récents concernant les modifications cutanées provoquées par l'âge ou les UV et leur traitement médical envisagent spécifiquement l'acide rétinoïque, les α -hydroxy acides et la DHEA, mais ne mentionnent pas les 7-

hydroxystéroïdes (Gilchrest, *Brit. J. Dermatol.* 135: 867-875, 1996; Watson & coll., *Drugs & Aging* 2: 274-291, 1996).

La production de dérivés 7-hydroxylés de la DHEA est connue depuis longtemps, dans les tissus du fœtus humain (Sulcova & coll., *Endocr. Experiment.* 2: 167-172, 1968), dans l'épithélium amniotique (Sulcova & coll., *J. Steroid Biochem.* 7: 101-104, 1976), le foie humain (Starka, *Sond. Zeit. Natur.* 17: 1-2, 1965), les testicules et l'épididyme humains (Sulcova & Starka, *Experimentia* 28: 1361-1362, 1972) et dans les pré-adipocytes humains (Khalil & coll. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 46: 585-594, 1993). Par ailleurs, les taux circulants de 7 α -hydroxy-DHEA ont été mesurés chez des femmes préménopausées à 200-300 pg/ml (Skinner & coll. *Steroids* 30: 315-330, 1977) et la 3 β , 7 α -dihydroxy-5 α -androstan-17-one (7 α -hydroxy-isoandrosterone) a été caractérisée dans les urines humaines (Jacolot & coll. *J. Steroid Biochem.* 14: 663-669, 1981). Plus récemment, le phénomène de la 7-hydroxylation a été étendu à d'autres stéroïdes qui possèdent, en commun avec la DHEA, une structure 3 β -hydroxylée. Il s'agit de la PREG (Akwa & coll. *Biochem. J.* 288: 959-964, 1992; Morfin & Courchay *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 50: 91-100, 1994), du 5 α -androstan-3 β , 17 β -diol (Morfin & coll. *Biochimie* 59: 637-644, 1977; Morfin & coll. *J. Steroid Biochem.* 12: 629-632, 1980), du 3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-one (Akwa & coll. *Biochem. J.* 288: 959-964, 1992) et du 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one (Strömstedt & coll. *Molec. Pharmacol.* 44: 1077-1083, 1993).

Quelques travaux sur des stéroïdes 7-hydroxylés ont prouvé qu'ils étaient dénués d'effets hormonaux propres tant androgènes qu'oestrogènes ou sur la sécrétion des hormones hypophysaires (Celotti & coll. *J. Steroid Biochem.* 18: 397-401, 1983; Sunde & coll. *J. Steroid Biochem.* 16: 483-488, 1982). L'ensemble de ces résultats a donc conduit à considérer la 7-hydroxylation

des stéroïdes comme un processus terminal d'inactivation hormonale conduisant à l'excrétion urinaire et biliaire des stéroïdes 7-hydroxylés produits (Ofner & coll. *J. Steroid Biochem.* 11: 1367-1379, 1979; Strömstedt & coll. *Molec. Pharmacol.* 44: 1077-1083, 1993; Khalil & coll. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 48: 545-552, 1994). Ce n'est que très récemment que les effets multiples constatés avec la DHEA (Watson & coll. *Drug & Aging* 9: 274-291, 1996) ont pu être expliqués en partie par les propriétés immunostimulatrices de ses dérivés 7-hydroxylés (Morfin & Courchay *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 50: 91-100, 1994; Padgett & Loria *J. Immunol.* 153: 1544-1552, 1994; Loria & coll. *J. Endocrinol.* 150: S209-S220, 1996). Les propriétés antiglucocorticoïdes présentées par la 7 α - et la 7 β -hydroxy-DHEA ont été prouvées et étendues à d'autres stéroïdes 7-hydroxylés comme ceux décrits dans les demandes de brevet PCT publiées sous les numéros WO 93/20687 et WO 94/08588 pour leur rôle dans le déclenchement des processus immunitaires.

Il apparaît donc que la DHEA et la production de ses dérivés 7-hydroxylés diminuent avec l'âge alors que celle des glucocorticoïdes ne varie pas. Au cours du vieillissement, l'apport de stéroïdes hormonaux au niveau cutané se trouve donc modifié avec une prédominance en glucocorticoïdes dont les effets promoteurs du vieillissement cutané sont connus.

En conséquence, un apport localisé en stéroïdes 7-hydroxylés dotés d'un effet antiglucocorticoïde particulier mais naturel permet de ramener la peau traitée dans son contexte stéroïdien du jeune âge.

Or, ces propriétés n'ont jamais été décrites ou suggérées dans l'art antérieur. Ainsi, la demande de brevet PCT publiée sous le numéro WO 94/08588 ne décrit ni n'enseigne aucune application cosmétique ou dermatologique de dérivés d'hormones stéroïdes. En outre, cette demande de brevet vise des dérivés stéroïdiens dans lesquels les

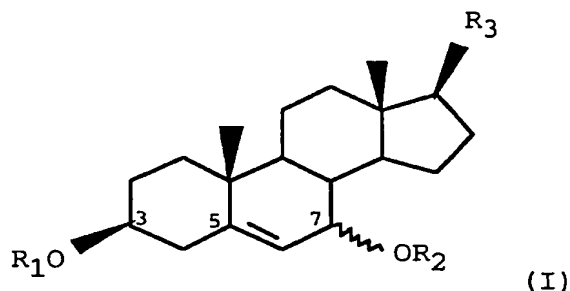
substitutions en position 3 et 7 indiquées dans la formule (I) ci-après sont, soit des hydroxyles, soit des fonctions esters de 1 à 10 atomes de carbone.

La demande de brevet Européen publiée sous le
5 numéro 415 766 décrit l'utilisation d'agents rétinoïdes pour combattre l'atrophie cutanée par un mécanisme antiglucocorticoïde. Or, il n'existe aucune parenté de structure entre les rétinoïdes (vitamine A et ses dérivés) et les stéroïdes.

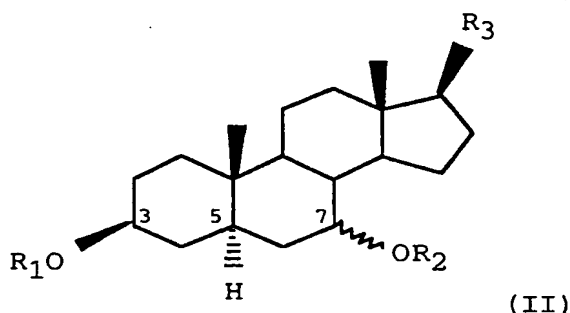
10 La demande de brevet Européen publiée sous le numéro 189 738 décrit l'utilisation de la déhydroépiandrosterone (DHEA) et de ses dérivés esters pour traiter le dessèchement de la peau, or ces composés sont différents des stéroïdes objet de la présente invention.

15 La demande de brevet européen publiée sous le numéro 723 775 envisage l'utilisation du sulfate de DHEA dans des compositions cosmétiques et dermatologiques et suggère l'addition dans ces compositions d'hormones stéroïdes autres que le sulfate de DHEA, comme des
20 androgènes, des oestrogènes, des progestagènes. Mais, comme indiqué précédemment, ces stéroïdes sont dénués d'action hormonale, et leur utilisation n'a pour but que de palier aux effets hormonaux indésirables de la DHEA et du sulfate de DHEA. En outre, le sulfate de DHEA n'a aucune parenté
25 structurale avec les stéroïdes objet de la présente invention.

L'invention est donc relative à l'utilisation, dans une composition cosmétique ou dermatologique à
30 application topique destinée à prévenir ou traiter les manifestations du vieillissement cutané et/ou les effets d'irradiations UV sur la peau, d'un composé 7α ou 7β substitué de la DHEA ou de la PREG, réduits ou non en position 5, et donc répondant à la formule :



ou à la formule :



dans lesquelles :

R_1 est choisi parmi : un atome d'hydrogène, les fonctions ester d'acide organique de 1 à 24 atomes de carbone, ester sulfurique ou ester phosphorique, ou ether carboné de 1 à 24 atomes de carbone comprenant zéro ou plusieurs atomes d'azote, les ethers d'hydrates de carbone de 3 à 100 atomes de carbone et leurs dérivés dont ceux comprenant ou non un ou plusieurs atomes d'azote.

R_2 est choisi parmi : un atome hydrogène ou une fonction ester d'acide gras de 1 à 24 atomes de carbone.

R_3 est choisi parmi : un atome d'hydrogène, un groupe -OH, les groupes de formules : $-\text{CO}-\text{R}_4$, $-\text{CHOH}-\text{R}_4$, $=\text{CH}-\text{CH}_3$, $=\text{COH}-\text{CH}_3$, $-\text{CHR}_4-\text{CH}_3$, $=\text{O}$, dans lesquels R_4 est un groupe alcoyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, de préférence méthyle, substitué ou non.

Les composés de l'invention sont des dérivés 7α ou 7β substitués de la DHEA ou de la PREG et plus particulièrement encore des dérivés 7α ou 7β -hydroxylés réduits ou non en position 5.

Un groupe de composés préférés de l'invention sont les dérivés 7 α -hydroxylés, c'est à dire ceux dans lesquels l'oxygène porté dans la position 7 est axial (7 α) et le substituant R₂ est un hydrogène .

5 Un autre groupe de composés préférés de l'invention sont ceux où R₁ est l'hydrogène, notamment la 7 α -hydroxy-DHEA et la 7 α -hydroxy-isoandrosterone où R₃ est une cétone (=O) .

10 Il convient de remarquer que les dérivés de l'invention dans lesquels R₁ est un acide organique présentent une liposolubilité accrue qui offre l'avantage d'améliorer la rétention de ces composés dans les cellules, notamment au niveau des membranes et par conséquent de prolonger leur activité et leur effet sur les cellules
15 cutanées. Parmi ces dérivés, on préfère ceux dans lesquels R₁ est un palmitate, un oléate ou un férulate, et notamment le 3 β -palmitoyl-7 ξ -hydroxy-DHEA, le 3 β -oleyl-7 ξ -hydroxy-DHEA et le 3 β -feruloyl-7 ξ -hydroxy-DHEA.

20 Les compositions cosmétiques ou dermatologiques de l'invention peuvent comprendre ou un ou plusieurs dérivés de stéroïde selon l'invention, ainsi que d'autres composés connus pour leur propriété cosmétologique ou dermatologique comme des hormones, et, bien entendu, les adjuvants ou véhicules classiquement utilisés dans ces
25 domaines.

30 Pour l'utilisation d'un dérivé de stéroïde de l'invention dans une composition cosmétique destinée à compenser, traiter et/ou prévenir les effets cutanés du vieillissement et/ou les effets d'irradiations UV sur la peau, ledit dérivé est administré à une dose comprise entre 0,05 et 10 mg par application et par jour et de préférence entre 0,05 et 5 mg par application et par jour.

35 L'effet de restauration ou de prévention du vieillissement cutané chez les personnes d'un certain âge ainsi que des effets protecteurs vis-à-vis des UV est

applicable pour tout traitement visant à restaurer le tonus cutané, rafermir la peau et effacer les rides.

De par leur nature, les dérivés de l'invention peuvent être mis en oeuvre sous des formes galéniques très diverses pour leur administration percutanée. Il peut s'agir de formes résultant de l'addition aux dérivés de l'invention de composés acceptables en cosmétique et permettant de réaliser des crèmes, des pâtes, des gels, des lotions, des émulsions "eau dans l'huile" ou "huile dans l'eau" ainsi que des formes composées de liposomes de micelles simples ou mixtes ou autres promoteurs de pénétration tels les lysophospholipides, les cyclodextrines, du polyéthylène glycol, des tensioactifs, des alcools, des acides gras, des huiles végétales. Cette liste n'est pas limitative et toute autre présentation connue de l'homme peut être envisagée dès lors qu'elle est adaptée aux dérivés stéroïdiens de l'invention qui ont comme caractéristique d'être à la fois hydrosolubles et liposolubles. Ainsi, les compositions cosmétiques ou dermatologiques de l'invention peuvent se présenter sous forme de crèmes, lotions, gels et pommades ou tout autre forme généralement utilisées pour des applications topiques.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, donnés à titre non limitatif, et montrant les performances obtenues par les dérivés de l'invention comme agents antiapoptotiques, antiradicalaires et promoteurs de la prolifération de cellules cutanées humaines.

Exemple 1 : Effets du $3\beta,7\alpha$ -dihydroxy-5-androstene-17-one (7α -hydroxy-DHEA) et du $3\beta,7\alpha$ -dihydroxy-5 α -androstane-17-one (7α -hydroxy-ISOA) sur l'apoptose cellulaire induite par les glucocorticoïdes.

Le thymus de souris C57BL/6 âgées de 4 semaines

est prélevé. La culture des thymocytes est réalisée pendant 6 heures en milieu RPMI 1640 et en présence ou en l'absence du stéroïde testé. L'apoptose (fragmentation de l'ADN) est mesurée par cytométrie de flux après marquage par l'iodure de propidium. Le phénomène apoptotique est contrôlé par électrophorèse de l'ADN révélée par le bromure d'éthidium selon la technique classique (observation d'échelles de 200 paires de bases). Les résultats rapportés dans le tableau I ci-dessous ont été obtenus:

Tableau I

Stéroïdes dans le milieu (dans 10ml d'éthanol)	Cellules apoptotiques (%)
Ethanol seul	41,5
Dexaméthasone 10^{-6} M	72,7
Dexaméthasone 10^{-6} M + DHEA 10^{-6} M	39,0
Dexaméthasone 10^{-6} M + 7 α -hydroxy-DHEA 10^{-6} M	58,8
Dexaméthasone 10^{-6} M + 7 α -hydroxy-ISOA 10^{-6} M	72,0
Dexaméthasone 10^{-5} M	73,5
Dexaméthasone 10^{-5} M + DHEA 10^{-5} M	51,4
Dexaméthasone 10^{-5} M + 7 α -hydroxy-DHEA 10^{-5} M	48,6
Dexaméthasone 10^{-5} M + 7 α -hydroxy-ISOA 10^{-5} M	46,3

Il apparaît de ces essais que les 7 α -hydroxystéroïdes testés ont un effet antiapoptotique s'opposant à celui de la dexaméthasone sur les cellules T de souris. Leur effet à 10^{-5} M est supérieur à celui de leur stéroïde précurseur (la DHEA ou déhydroépiandrostérone ou 3 β -hydroxy-5-androstène-17-one).

Exemple 2 : Effets de la 3 β ,7 α -dihydroxy-5-androstène-17-one (7 α -hydroxy-DHEA) sur la viabilité de kératinocytes humains en culture.

Des kératinocytes humains sont obtenus à partir de pièces chirurgicales et sont cultivés en monocouche jusqu'à préconfluence. La 7 α -hydroxy-DHEA est administrée à

ces cultures à diverses concentrations en solution éthanolique (10 %), chaque concentration étant testée en octuple. Des contrôles sont effectués avec l'éthanol seul (10%). Après 24 heures, la viabilité des kératinocytes est mesurée par test au MTT (3-(4,5-diméthyl thiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) où la succinate déshydrogénase mitochondriale transforme le MTT en cristaux bleus de formazan solubles dans le DMSO (Mosmann, J. *Immunol. Methods* 65: 55-63, 1983). Les résultats des essais sur la viabilité des kératinocytes sont rapportés dans le tableau II ci-après. La viabilité cellulaire est calculée selon la formule :

$$\% \text{ viabilité} = \text{DO}_{540} \text{ produit} \times 100 / \text{DO}_{540} \text{ témoin}.$$

Toute valeur supérieure à 100 indique un produit favorisant la viabilité cellulaire.

Tableau II

Stéroïdes dans le milieu (dans 10 % d'éthanol)	Viabilité des kératinocytes (%)
10 % d'éthanol seul (témoin)	100
7 α -hydroxy-DHEA 10 ⁻⁴ M	124 \pm 10
7 α -hydroxy-DHEA 5.10 ⁻⁵ M	111 \pm 7
7 α -hydroxy-DHEA 10 ⁻⁵ M	119 \pm 7
7 α -hydroxy-DHEA 5.10 ⁻⁶ M	147 \pm 9
7 α -hydroxy-DHEA 10 ⁻⁶ M	154 \pm 6
7 α -hydroxy-DHEA 5.10 ⁻⁷ M	139 \pm 3
7 α -hydroxy-DHEA 10 ⁻⁷ M	147 \pm 5
7 α -hydroxy-DHEA 10 ⁻⁸ M	127 \pm 3

Ces résultats montrent que la 7 α -hydroxy-DHEA augmente significativement la viabilité des kératinocytes humains aux concentrations entre 10⁻⁴M et 10⁻⁸M, le maximum (augmentations entre 54% et 39% de la viabilité) étant obtenu entre 5.10⁻⁶M et 10⁻⁷M. Par ailleurs, aucune cytotoxicité n'a été observée. D'autres tests comparatifs

ont démontré que le précurseur DHEA était sans effet (100 ± 5).

Exemple 3 : Effets de la $3\beta,7\alpha$ -dihydroxy-5-androstène-17-one (7α -hydroxy-DHEA) sur la prolifération de fibroblastes humains en culture.

Les cultures de fibroblastes humains (femme de 32 ans) sont ensemencées en plaques 24 puits à raison de 50 000 cellules/puits dans le milieu de culture standard (DMEM, gentamycine, amphotéricine B, pénicilline, L-glutamine, 10% SVF). Les essais sont effectués sur 4 séries de 3 puits. Après 24 h, les fibroblastes adhèrent au support et 3 séries sont traitées par la 7α -hydroxy-DHEA aux concentrations de 10^{-6} M, 5.10^{-6} M et 10^{-7} M. La quatrième série ne contient que le vecteur (éthanol). Les milieux sont renouvelés quotidiennement, et à 96 h (72 h de contact de la 7α -hydroxy-DHEA à l'essai), les fibroblastes sont comptés sur cellule de Malassez en présence de bleu trypan.

Les résultats des effets sur la prolifération des fibroblastes sont rapportés dans le tableau III ci-dessous.

Tableau III

Stéroïdes dans le milieu	Nombre de Fibroblastes	Augmentation de la viabilité (%)
Témoin	190 667 \pm 6 766	/
7α -hydroxy-DHEA 10^{-7} M	230 667 \pm 8 511	+ 21
7α -hydroxy-DHEA 10^{-6} M	268 000 \pm 27 154	+ 41
7α -hydroxy-DHEA 5.10^{-6} M	258 667 \pm 3 351	+ 36

Ces résultats démontrent que, dans les conditions expérimentales, le traitement des fibroblastes par la 7α -hydroxy-DHEA à 10^{-7} M, 10^{-6} M et 5.10^{-6} M augmente la prolifération cellulaire respectivement de 21%, 41% et 36% par rapport aux fibroblastes témoins non traités.

Exemple 4 : Effet anti-radicalaire du 3 β ,7 α -dihydroxy-5-androstène-17-one (7 α -hydroxy-DHEA) sur une suspension de kératinocytes humains.

Des kératinocytes provenant d'un donneur sain (femme de 25 ans) sont cultivés jusqu'au stade subconfluent en milieu spécifique (KGM) pour la prolifération des kératinocytes. Les suspensions obtenues sont réparties en triplicata dans 4 séries dont 3 sont irradiées pendant 30 min avec une lampe émettant des UVA afin d'activer la production de radicaux libres. Parmi les trois séries irradiées, une contient les vitamines C+E (0,7%) et sert de référence de protection, une contient la 7 α -hydroxy-DHEA à 10⁻⁶M et la dernière sert de contrôle. Le tableau IV ci-après rapporte la mesure des effets anti-radicalaires.

Les radicaux libres produits génèrent des peroxydes lipidiques qui sont dosés par chemiluminescence (Belghmi & coll. *J. Biolum. Chemilum.* 2: 113-119, 1982). L'efficacité de la 7 α -hydroxy-DHEA est calculée sur la base des témoins non irradiés et de la référence de protection.

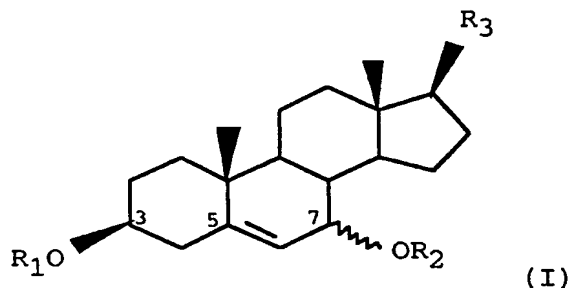
Tableau IV

Kératinocytes	Chemiluminescence	Efficacité
Témoins non irradiés	2 529 \pm 153	/
Témoins irradiés	427 750 \pm 137 322	/
Irradiés + 0,7% Vit. C+E	2 970 \pm 288	100%
Irradiés + 7 α -hydroxy-DHEA 10 ⁻⁶ M	44 164 \pm 13 303	90%

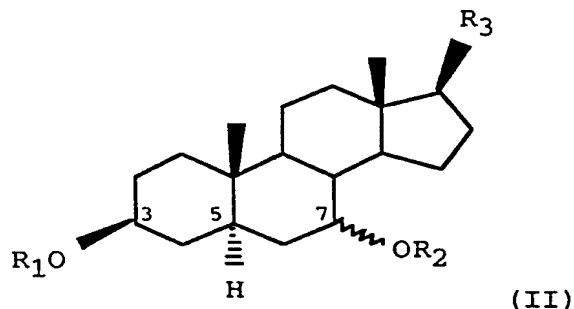
Dans les conditions de cette étude, l'efficacité antiradicalaire *in vitro* de la 7 α -hydroxy-DHEA à 10⁻⁶M est de 90%. La 7 α -hydroxy-DHEA peut être considérée comme un bon produit antiradicalaire.

REVENDICATIONS

1) Utilisation dans une composition pour prévenir
ou traiter les manifestations du vieillissement cutané
et/ou les effets d'irradiations UV sur la peau, d'un
composé répondant à la formule :



ou à la formule :



dans lesquelles :

R_1 est choisi parmi : un atome d'hydrogène, les
fonctions ester d'acide organique de 1 à 24 atomes de
carbone, ester sulfurique ou ester phosphorique, ou ether
carboné de 1 à 24 atomes de carbone comprenant zéro ou
plusieurs atomes d'azote, les ethers d'hydrates de carbone
de 3 à 100 atomes de carbone et leurs dérivés comprenant ou
non un ou plusieurs atomes d'azote.

R_2 est choisi parmi : un atome hydrogène ou une
fonction ester d'acide gras de 1 à 24 atomes de carbone.

R_3 est choisi parmi : un atome d'hydrogène, un
groupe -OH, les groupes de formules : $-\text{CO}-\text{R}_4$, $-\text{CHOH}-\text{R}_4$,
 $=\text{CH}-\text{CH}_3$, $=\text{COH}-\text{CH}_3$, $-\text{CHR}_4-\text{CH}_3$, $=\text{O}$, dans lesquels R_4 est un

groupe alcoyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone substitué ou non.

5 2) Utilisation d'un composé de formules (I) ou (II), selon la revendication 1, dans lesquelles R₂ et/ou R₁ est un atome d'hydrogène.

10 3) Utilisation d'un composé de formules (I) ou (II), selon l'une des revendications 1 ou 2, dans lesquelles R₃ est une cétone.

15 4) Utilisation d'un composé de formules (I) ou (II), selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lesquelles R₁ est une fonction ester d'acide gras choisi parmi un oléate, un palmitate, un férulate.

20 5) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que le composé de formule (I) ou (II) est de la 7 α -hydroxy-DHEA.

 6) Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le composé de formule (I) ou (II) est la 7 α -hydroxy-isoandrosterone.

25 7) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que le composé de formule (I) ou (II) est choisi parmi le 3 β -palmitoyl-7 ξ -hydroxy-DHEA, le 3 β -oleyl-7 ξ -hydroxy-DHEA et le 3 β -feruloyl-7 ξ -hydroxy-DHEA.

30 8) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition contient au moins un composé de formule (I) ou (II) associé à un ou plusieurs adjuvants ou véhicules utilisés en cosmétologie ou dermatologie.

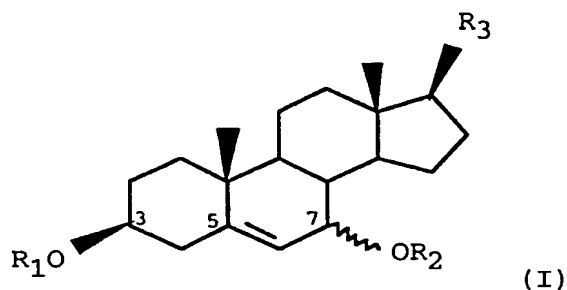
35

9) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition contient entre 0,05 et 10 mg et de préférence entre 0,05 et 5 mg d'un composé de formule (I) ou (II).

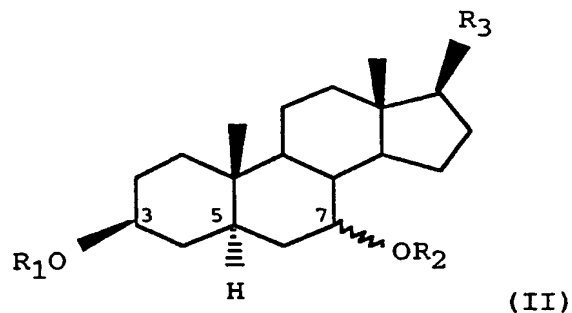
5

10) Procédé de traitement cosmétique des manifestations du vieillissement cutané et/ou des effets d'irradiations UV sur la peau, comprenant l'application sur la peau d'une composition cosmétique constenant au moins un composé répondant à la formule :

10



ou à la formule :



15

dans lesquelles :

20

R₁ est choisi parmi : un atome d'hydrogène, les fonctions ester d'acide organique de 1 à 24 atomes de carbone, ester sulfurique ou ester phosphorique, ou ether carboné de 1 à 24 atomes de carbone comprenant zéro ou plusieurs atomes d'azote, les ethers d'hydrates de carbone de 3 à 100 atomes de carbone et leurs dérivés comprenant ou non un ou plusieurs atomes d'azote.

R₂ est choisi parmi : un atome hydrogène ou une

fonction ester d'acide gras de 1 à 24 atomes de carbone.

5 R_3 est choisi parmi : un atome d'hydrogène, un groupe -OH, les groupes de formules : -CO- R_4 , -CHOH- R_4 , =CH-CH₃, =COH-CH₃, -CHR₄-CH₃, =O, dans lesquels R_4 est un
groupe alcoyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone substitué ou non.

10 11) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend l'application sur la peau d'une dose de ladite composition comprise entre 0,05 et 10 mg par application et par jour et de préférence entre 0,05 et 5 mg par application et par jour.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/FR 98/00457

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K31/565 A61K31/57 A61K7/48		
According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 94 08588 A (CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET MÉTIERS) 28 April 1994 cited in the application see page 8, line 17 - line 28 see page 18, line 16 - page 19, line 29 see example IV see page 23, line 18 - page 25 see claims 1-3 ---	1-3,5,6, 8-11
Y	EP 0 415 766 A (ORTHO PHARMACEUTICAL CORPORATION) 6 March 1991 see page 2, line 14 - line 53 --- <div style="text-align: center;">-/--</div>	1-3,5,6, 8-11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center;">9 June 1998</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center;">17/06/1998</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center;">Alvarez Alvarez, C</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/FR 98/00457

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 189 738 A (NORMAN ORENTREICH) 6 August 1986 see abstract see page 6, line 4 - line 13 see page 18; table 1 see claims 1,10,12,18 -----	7
A	EP 0 723 775 A (L'OREAL) 31 July 1996 see the whole document & FR 2 729 854 A cited in the application -----	1,10
A	WO 95 10283 A (J.W.BROADBENT NOMINEES PTY. LTD.) 20 April 1995 see page 6 - page 7 -----	1,2,8,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/FR 98/00457

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9408588 A	28-04-1994	FR 2696934 A EP 0665752 A JP 8505124 T	22-04-1994 09-08-1995 04-06-1996
EP 415766 A	06-03-1991	US 5019569 A AT 147265 T AU 634807 B AU 6198790 A DE 69029625 D DE 69029625 T DK 415766 T ES 2098253 T GR 1000723 B JP 3141218 A PT 95150 A,B	28-05-1991 15-01-1997 04-03-1993 07-03-1991 20-02-1997 28-05-1997 27-01-1997 01-05-1997 23-11-1992 17-06-1991 22-05-1991
EP 189738 A	06-08-1986	US 4496556 A AU 580028 B AU 3812785 A US 4542129 A	29-01-1985 22-12-1988 07-08-1986 17-09-1985
EP 723775 A	31-07-1996	FR 2729854 A DE 69600115 D DE 69600115 T ES 2113219 T JP 8231342 A	02-08-1996 22-01-1998 02-04-1998 16-04-1998 10-09-1996
WO 9510283 A	20-04-1995	AU 684845 B AU 7934094 A CA 2170591 A EP 0804204 A ZA 9407912 A	08-01-1998 04-05-1995 20-04-1995 05-11-1997 24-05-1995

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande internationale No
PCT/FR 98/00457

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 A61K31/565 A61K31/57 A61K7/48		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 94 08588 A (CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET MÉTIERS) 28 avril 1994 cité dans la demande voir page 8, ligne 17 - ligne 28 voir page 18, ligne 16 - page 19, ligne 29 voir exemple IV voir page 23, ligne 18 - page 25 voir revendications 1-3 ---	1-3, 5, 6, 8-11
Y	EP 0 415 766 A (ORTHO PHARMACEUTICAL CORPORATION) 6 mars 1991 voir page 2, ligne 14 - ligne 53 --- <div style="text-align: center;">-/--</div>	1-3, 5, 6, 8-11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center;">9 juin 1998</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center;">17/06/1998</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center;">Alvarez Alvarez, C</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande Internationale No
PCT/FR 98/00457

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 189 738 A (NORMAN ORENTREICH) 6 août 1986 voir abrégé voir page 6, ligne 4 - ligne 13 voir page 18; tableau 1 voir revendications 1,10,12,18 ---	7
A	EP 0 723 775 A (L'OREAL) 31 juillet 1996 voir le document en entier & FR 2 729 854 A cité dans la demande ---	1,10
A	WO 95 10283 A (J.W.BROADBENT NOMINEES PTY. LTD.) 20 avril 1995 voir page 6 - page 7 -----	1,2,8,10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

...ande internationale No
PCT/FR 98/00457

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9408588 A	28-04-1994	FR 2696934 A EP 0665752 A JP 8505124 T	22-04-1994 09-08-1995 04-06-1996
EP 415766 A	06-03-1991	US 5019569 A AT 147265 T AU 634807 B AU 6198790 A DE 69029625 D DE 69029625 T DK 415766 T ES 2098253 T GR 1000723 B JP 3141218 A PT 95150 A,B	28-05-1991 15-01-1997 04-03-1993 07-03-1991 20-02-1997 28-05-1997 27-01-1997 01-05-1997 23-11-1992 17-06-1991 22-05-1991
EP 189738 A	06-08-1986	US 4496556 A AU 580028 B AU 3812785 A US 4542129 A	29-01-1985 22-12-1988 07-08-1986 17-09-1985
EP 723775 A	31-07-1996	FR 2729854 A DE 69600115 D DE 69600115 T ES 2113219 T JP 8231342 A	02-08-1996 22-01-1998 02-04-1998 16-04-1998 10-09-1996
WO 9510283 A	20-04-1995	AU 684845 B AU 7934094 A CA 2170591 A EP 0804204 A ZA 9407912 A	08-01-1998 04-05-1995 20-04-1995 05-11-1997 24-05-1995